

Blindversuche
zur ABO-, MN-, Hp- und Gm-Bestimmung
an Blutflecken

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
in der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Friedrich Münscher
aus Vockerode-Dinkelberg

Marburg 1967

**Blindversuche
zur ABO-, MN-, Hp- und Gm-Bestimmung
an Blutflecken**



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
in der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Friedrich Münscher
aus Vockerode-Dinkelberg

Marburg 1967



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 28. November 1967

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr.med. Siegert

Referent: Prof. Dr.med. Schleyer

Correferent: Doz. Dr.med. Schiff

Inhalt

	Seite
A. <u>Aufgabe der Untersuchung und Material</u>	1
B. <u>ABO-System</u>	2
1. Methodik	2
a) Mischagglutination	2
b) Absorption-Elution	4
c) Methode nach LATTES	6
d) Verfahren nach HARLEY und MERKELEY	7
2. Ergebnisse	9
3. Besprechung	13
C. <u>MN-System</u>	19
1. Methodik	19
a) Mischagglutination	19
b) Absorption-Elution	19
2. Ergebnisse	20
3. Besprechung	22
D. <u>Haptoglobin-System</u>	25
1. Methodenangaben der Literatur	25
2. Eigene Versuche	27
3. Ergebnisse und Besprechung	28
E. <u>Gm-System</u>	31
1. Grundlage und Methodik	31
2. Ergebnisse	33
3. Besprechung	34
F. <u>Zusammenfassung</u>	35
G. <u>Literatur</u>	36

A. Aufgabe der Untersuchung und Material

Zur Bestimmung von Blutgruppeneigenschaften und Serumfaktoren an eingetrockneten Blutflecken sind in der Literatur zahlreiche Methoden angegeben. Um eine Blutspur mit ausreichender Sicherheit identifizieren zu können, empfiehlt es sich, möglichst mehrere Verfahren gleichzeitig anzuwenden. Die Ergebnisse lassen sich nur unter Berücksichtigung der Fehlerquoten der einzelnen Methoden verwerten. Die Literatur enthält bisher nur wenige Angaben über systematische Fehlerbestimmungen. In der vorliegenden Untersuchung sollten daher einige Verfahren zur ABO-, MN-, Hp- und Gm(a)-Bestimmung an Blutflecken auf ihre Zuverlässigkeit untersucht werden. Die Untersuchung wurde auf diese Systeme beschränkt, weil ihre Bestimmung für die Praxis der Blutspurenanalyse ausreicht.

Für die Untersuchungen wurden insgesamt 40 bis 71 Tage alte Blutflecken verwendet. Dazu waren saubere Leinenstücke mit Probandenblut von Blutgruppenuntersuchungen betropft und mit Nummern versehen worden. Die Lättchen wurden bei Zimmertemperatur getrocknet und bis zum Untersuchungsbeginn im Kühlschrank bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Die Gruppen und Faktoren der Blutproben wurden erst nach Niederschrift aller Ergebnisse mit den von einem anderen Untersucher an den frischen Blutproben ermittelten Resultaten verglichen.

Für das ABO-, MN- und Gm-System wurden die bei SCHLEYER referierten optimalen Methoden angewandt. Erst nach Einarbeitung in die Methodik wurde mit den Hauptversuchen begonnen.

B. ABO - System

1. Methodik

a) Mischagglutination

Prinzip: Die Mischagglutination ist ein Antigen-Nachweis. Dem an die Textilfaser fixierten Agglutinogen werden Agglutinine zugefügt. Der homologe Antikörper wird an das Antigen gebunden und dadurch an die Faser fixiert. Nichtgebundener Antikörper wird durch Waschen entfernt. Gibt man dann homologe Testblutkörperchen zu, so werden diese durch den am Substrat fixierten Antikörper agglutiniert. Der Antikörper ist (nach der Modellvorstellung) "bivalent". Heterologer Antikörper wird nicht an die Faser gebunden, es können also auch keine Testblutkörperchen agglutiniert werden (WIENER-HERMAN, COOMBS und Mitarb.). Bei diesem Verfahren werden einem nichtagglutinierbaren Substrat (Textilfaser) antigengleiche Indikatorzellen zugemischt ("Mischagglutination"). COOMBS und DODD führten diese Methodik in die Blutspurendiagnostik an Textilfasern ein.

Technik (im wesentlichen nach SCHLEYER 1966, dort die Grundlagenliteratur): Ein kleines Stückchen des zu untersuchenden Blutfleckens (etwa $1/8 \text{ cm}^2$) wurde ausgeschnitten und zur Fixierung für 15-20 min in Methanol eingelegt. Nach Auspressen und Lufttrocknen des Stoffes wurde das Gewebe in zarte Fibrillen zerfasert. Wenn man mit einem scharfen Messer flach über die Stofffasern schabt, entsteht ein feines, lockeres Flöckchen. Das Auffasern des Stoffes in feinste Fibrillen ist besonders wichtig, da sich die Reaktionen nur an einzelnen Fibrillen eindeutig ablesen

lassen. Da der Stoff durch die Fixierung sehr spröde wird und sich schlecht auffasern läßt, wurde im Laufe der Untersuchung dazu übergegangen, den Stoff zuerst aufzufasern und dann das Flöckchen zu fixieren. Das Material wurde nun auf zwei hydrophobisierte Röhrchen verteilt. (Präparation der Röhrchen: Benetzen mit 1% Silikonöl-Lösung in Chloroform, diese 4-5 h bei 200°C einbrennen lassen.) Nach Zugabe von 2 Tropfen Anti-A-Serum (Titer 1:128) oder Anti-B-Serum (Titer 1:256) wurde leicht zentrifugiert. Die Röhrchen blieben über Nacht im Kühlschrank bei +4°C stehen. Mit Pasteur'schen Pipetten wurde dann das Serum abgesaugt. (Die Pipetten waren aus einem Glasrohr über dem Bunsenbrenner ausgezogen worden.) Zur Entfernung nichtgebundenen Antikörpers wurde 6mal mit NaCl-Lösung gewaschen. Die Röhrchen wurden dabei jeweils halb gefüllt, es wurde einige Minuten gewartet (oder zentrifugiert) und dann die Waschlösung abgesaugt. Es ist darauf zu achten, daß die Fibrillen nicht mitabgesaugt werden. Die letzte Waschlösung enthält nach HANHOFF keine Antikörper mehr; sie kann aber auf negative Agglutination gegen A- und B-Blutkörperchen geprüft werden.

Jetzt wurden je 2-3 Tropfen frischer, dem Antiserum heterologer 1% Blutkörperchenaufschwemmung zugegeben und die Ansätze 10 min unter Aufschütteln stehengelassen. Es wurde dann 2 min niedrig zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Spursubstrat mit Pasteur'scher Pipette auf einen Hohlschliff-Objektträger übertragen. Nach Zugabe von 1 Tropfen NaCl-Lösung wurde sofort mikroskopiert.

Als positiv wurde die Reaktion angesehen, wenn an den Fibrillen mehrere Erythrozyten oder Erythrozytentrauben hafteten. Bei negativem Ergebnis lagen die zugegebenen Testblutkörperchen einzeln. Tab. I (nach HANHOFF) gibt eine Übersicht über die möglichen Reaktionen.

Tab. I. Die möglichen Reaktionen bei der Mischagglutination zur Bestimmung der ABO-Blutgruppen

Spur	A	A	B	B	O	O	AB	AB
Serum	B	A	B	A	B	A	B	A
Testblutkörperchen	A ₁	B	A ₁	B	A ₁	B	A ₁	B
Ergebnis	+	-	-	+	-	-	+	+

b) Absorption-Elution

Prinzip: Auch mit dieser Methode wird das Antigen nachgewiesen. Der homologe Antikörper wird an das Antigen gebunden (Absorption). Nichtgebundener Antikörper wird ausgewaschen. Nach Zusatz von Testblutkörperchen werden die an die Fasern gebundenen Agglutinine durch Erhöhen der Temperatur wieder abgelöst (Elution). Die Agglutination ist also nicht an den Stofffasern, sondern im Eluat abzulesen.

Technik (nach SCHLEYER 1966, dort weitere Lit.): Einige Fasern des Stoffes wurden zu feinen Flöckchen zerschabt, wie unter a beschrieben. Die Flöckchen wurden auf die 2 Vertiefungen eines Hohlsliff-Objektträgers verteilt. Nach dem Schema der Tab.I wurden je 1-2 Tropfen Antiserum zugegeben. Der Objektträger wurde mit einem umgekehrten Hohlsliff-Objektträger bedeckt, um ein Austrocknen zu

verhindern. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 2 h im Kühlschrank bei 4°C wurde das Antiserum mit Pasteur'schen Pipetten abgesaugt. Das Fasermaterial wurde auf dem Objektträger mindestens 6mal mit eiskalter NaCl-Lösung gewaschen, indem mit Pasteur'schen Pipetten die NaCl-Lösung zugetropft und nach mehrmaligem Hin- und Hersaugen wieder abgesaugt wurde. Die Testblutkörperchen wurden in 1% Aufschwemmung in NaCl-Lösung, die einen Gehalt von 1% Rinderalbumin hat, nach dem Schema der Tab.I zugefügt. Die Ansätze wurden 15 min in einer 1-2 h vorgewärmten feuchten Kammer bei 56°C inkubiert und danach bis zu 4 h in der feuchten Kammer bei Zimmertemperatur stehengelassen. Die Agglutination ist oft schon nach 1 h oder noch früher abzulesen, wird aber durch längeres Stehenlassen verstärkt.

Die Reaktionen wurden unter dem Mikroskop abgelesen, meistens waren die Agglutinate aber schon makroskopisch zu erkennen. Bei positiver Reaktion liegen die Agglutinate traubenförmig neben den Fasern. Das wird deutlich, wenn man die Fasern mit einer Nadel aus der Höhlung des Objektträgers herauszieht.

Das Reaktionsschema entspricht dem der Tab. I.

c) Methode nach LATTES

Prinzip: Die LATTESsche Methode ist ein Agglutinin-Nachweis. Sie ist für den Nachweis der Anti-A- und Anti-B-Agglutinine aus Blutkrusten gedacht, läßt sich aber auch gut für den Agglutinin-Nachweis an den Stofffasern verwenden. Die Testblutkörperchen werden dem Substrat direkt zugeführt, und es wird gewartet, bis sich Agglutinate bilden.

Technik: Von den Blutflecken wurden einige Fasern fein zerschnitten - bei Flecken mit Blutkrusten wurden außerdem Blutschüppchen abgekratzt -, auf 3 Objektträger gebracht und mit Deckgläsern bedeckt. Frische, ganz schwach konzentrierte Aufschwemmungen von A₁-, B- und O-Blutkörperchen wurden zugegeben, indem eine Pipette an den Rand des Deckglases gehalten wurde, so daß die Flüssigkeit von dem Spalt unter dem Deckglas aufgesaugt werden konnte. (Nach LUND sind Blutkörperchenkonzentrationen von 0,00625% 32mal empfindlicher für die Agglutination als solche von 0,5-1,0%). Die Ansätze wurden für 30 min bei Zimmertemperatur in der feuchten Kammer stehengelassen. Bei zunächst negativem Ergebnis wurden die Ansätze länger in der feuchten Kammer belassen. Oft traten noch nach 4 h deutliche Agglutinationen auf. Erst wenn nach 12 h keine Reaktion aufgetreten war, wurden die Ergebnisse als negativ bezeichnet.

Bei positivem Ergebnis lagen die Agglutinate um die Schüppchen und um die Fasern herum. Zur Kontrolle, ob echte Agglutinate vorlagen, wurde mit einer Nadel auf das Deckglas geklopft. Echte Agglutinate bewegen sich als Ganzes mit, Pseudoagglutinate lösen sich auf. Tab. II zeigt die möglichen Ergebnisse.

Tab. II. Die möglichen Reaktionen bei der LATTESschen Methode

Spur Agglutinin	A Anti-B			B Anti-A			O Anti-AB			AB -		
Testblut- körperchen	A ₁	B	O	A ₁	B	O	A ₁	B	O	A ₁	B	O
Ergebnis	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-

d) Verfahren nach HARLEY und MERKELEY

Unter den angegebenen Methoden zum Agglutinin-Nachweis an Blutflecken auf Stoff hat sich nach BRENIG die Technik nach HARLEY und MERKELEY als optimal erwiesen.

Prinzip: Der Flecken wird mit Wasser extrahiert. Dem Extrakt werden die Testblutkörperchen zugegeben.

Technik: Aus dem Blutflecken wurde ein Scheibchen von etwa 6 mm Durchmesser ausgeschnitten, auf einen gewachsenen Zwirnfaden aufgefädelt und so in ein Röhrchen gebracht, daß es den Boden berührte. Bei dünnen Flecken wurden 2 oder 3 Scheibchen auf den Faden aufgefädelt. Nach Zugabe von 2-4 ml Wasser, je nach Gewebe, wurde das Röhrchen mit einem Korken verschlossen, der gleichzeitig den Faden festhielt. Dann wurde leicht zentrifugiert und das Röhrchen 3 h bei Zimmertemperatur und über Nacht im Kühlschrank stehengelassen. Das Stoffscheibchen wurde dann angehoben und der Faden mit dem Korken fixiert. Durch Zentrifugieren

gelangte die Restflüssigkeit aus dem Scheibchen in den Extrakt.

Nach MERKELEY soll jetzt der Extrakt in eine dünne Pipette aufgezogen, diese über der Flamme verschlossen und anschließend zentrifugiert werden. Die Spitze der Pipette wird abgefeilt und der klare Extrakt auf drei Hohlschliff-Objektträger verteilt. Dieser Schritt wurde weggelassen, da die Extrakte nicht verunreinigt waren und in den Vorversuchen keine besseren Ergebnisse mit dieser Modifikation erzielt worden waren. Er ist aber bei starker Verunreinigung der Blutflecken angebracht.

Von dem Extrakt wurden also sogleich 3 Tropfen auf Hohlschliff-Objektträger gebracht und 3 gleichgroße Tropfen frischer 0,5% Blutkörperchen-Suspension nach dem Schema der Tab. II zugegeben. Die Objektträger wurden in eine feuchte Kammer gebracht. Nach 1 h wurde mit der Ablesung begonnen. Weitere Ablesungen folgten nach 4, 6, 12, 24 und 36 h, jedoch trat nach 12 h keine Agglutination mehr auf.

Bei positivem Ergebnis sah man unter dem Mikroskop je nach der Stärke der Agglutinine größere oder kleinere Agglutinate, die sich nicht auflösten, wenn man die Flüssigkeit durch Hineinblasen mit einer Pipette bewegte.

2. Ergebnisse

Tab. III. Mischagglutination

Nr.	Fleckenalter Tage	Blutgruppe des Fleckens	bestimmte Blutgruppe	Ergebnis
16	10	O	B	f
17	"	A	A	r
31	11	A	A	r
32	"	O	A	f
33	"	O	O	r
34	"	A	A	r
35	"	A	A	r
18	16	B	B	r
19	"	A	AB	f
20	"	A	A	r
21	"	A	A	r
36	22	A	A	r
37	"	A	A	r
38	"	A	A	r
39	"	B	B	r
40	"	O	O	r
22	23	A	A	r
23	"	O	AB	f
24	"	O	AB	f
25	"	O	O	r
26	28	A	AB	f
27	"	O	A	f
28	"	O	A	f
29	30	A	A	r
30	"	O	AB	f
1	31	A	A	r
2	"	A	A	r
3	41	A	AB	f
4	"	O	O	r
5	42	O	AB	f
6	"	O	A	f
7	"	A	O	f
8	"	AB	A	f
9	49	B	B	r
10	"	O	O	r
11	"	A	A	r
12	"	A	A	r
13	52	O	O	r
14	"	A	AB	f
15	"	A	AB	f

r = richtig

f = falsch

Tab. IV. Absorption-Elution

Nr.	Fleckenalter Tage	Blutgruppe des Fleckens	bestimmte Blutgruppe	Ergebnis
16	11	O	AB	f
17	"	A	A	r
18	"	B	B	r
19	"	A	A	r
20	"	A	A	r
31	18	A	A	r
32	"	O	A	f
33	"	O	O	r
34	"	A	A	r
35	"	A	AB	f
36	21	A	A	r
37	"	A	A	r
38	"	A	A	r
39	"	A	AB	f
40	"	O	O	r
1	34	A	A	r
2	"	A	A	r
21	35	A	AB	f
22	"	A	A	r
23	"	O	O	r
24	"	O	AB	f
25	"	O	B	f
26	"	A	AB	f
27	37	O	O	r
28	"	O	O	r
29	"	A	A	r
30	"	O	O	r
3	41	A	A	r
4	"	O	O	r
5	42	O	O	r
6	"	O	O	r
7	50	A	A	r
8	"	AB	AB	r
9	"	B	B	r
10	"	O	O	r
11	51	A	A	r
12	"	A	A	r
13	"	O	O	r
14	"	A	AB	f
15	"	A	A	r

Tab. V. Methode nach LATTES

Nr.	Fleckenalter Tage	Blutgruppe des Fleckens	bestimmte Blutgruppe	Ergebnis
31	12	A	AB	f
32	"	O	O	r
33	"	O	O	r
34	"	A	A	r
35	"	A	AB	f
36	"	A	A	r
37	"	A	AB	f
38	"	A	A	r
39	"	B	B	r
40	"	O	O	r
16	14	O	O	r
17	"	A	A	r
18	"	B	B	r
19	"	A	A	r
20	"	A	A	r
21	"	A	A	r
22	"	A	A	r
23	"	O	O	r
24	"	O	O	r
25	"	O	O	r
1	34	A	A	r
2	"	A	A	r
26	35	A	A	r
27	"	O	O	r
28	"	O	O	r
29	"	A	A	r
30	"	O	AB	f
3	42	A	A	r
4	"	O	O	r
5	"	O	O	r
6	"	O	AB	f
7	44	A	A	r
8	"	AB	AB	r
9	"	B	B	r
10	"	O	O	r
11	"	A	A	r
12	"	A	A	r
13	"	O	O	r
14	"	A	A	r
15	"	A	A	r

Tab. VI. Verfahren nach HARLEY und MERKELEY

Nr.	Fleckenalter Tage	Blutgruppe des Fleckens	bestimmte Blutgruppe	Ergebnis
31	22	A	A	r
32	"	O	O	r
33	"	O	A	f
34	"	A	A	r
35	"	A	AB	f
36	"	A	A	r
37	"	A	A	r
38	"	A	AB	f
39	"	B	B	r
40	"	O	O	r
1	34	A	A	r
2	"	A	A	r
16	35	O	O	r
17	"	A	AB	f
18	"	B	B	r
19	"	A	AB	f
20	36	A	A	r
21	"	A	A	r
22	"	A	AB	f
23	"	O	O	r
24	"	O	O	r
25	"	O	O	r
26	"	A	A	r
27	"	O	O	r
28	"	O	O	r
29	"	A	A	r
30	"	O	AB	f
3	55	A	A	r
4	"	O	O	r
5	"	O	O	r
6	"	O	B	f
7	"	A	A	r
8	"	AB	AB	r
9	"	B	B	r
10	"	O	O	r
11	"	A	A	r
12	"	A	A	r
13	"	O	O	r
14	"	A	A	r
15	"	A	A	r

3. Besprechung

Die Fehlerquoten der angewandten Methoden sind in Tab. VII zusammengestellt.

Tab. VII. Die Fehlerquoten der 4 angewandten Verfahren insgesamt

Methode	Fehler in %
Mischagglutination	40
Absorption-Elution	23
LATTES-Methode	13
Verfahren nach HARLEY	20

In der Sicherheit der Blutfleckendiagnose ist der Absättigungsversuch diesen Verfahren weit überlegen; seine Fehlerquote beträgt nach SCHLEYER 5%.

Tab. VIII gibt die Beteiligung der einzelnen Gruppen an den Fehlbestimmungen wieder. Anscheinend entstehen bei der Bestimmung der Gruppe O die meisten Fehler. Die Gruppe B wurde immer richtig bestimmt. Die verschiedenen Methoden haben - unter Berücksichtigung ihrer Fehlerquoten - auf die Beteiligung der einzelnen Gruppen an den Fehlbestimmungen keinen nennenswerten Einfluß.

Tab. VIII. Beteiligung der 4 Blutgruppen an den Fehlbestimmungen

Methode	A		B		AB		0	
	n	davon falsch	n	davon falsch	n	davon falsch	n	davon falsch
Mischagglutination	21	6	3	-	1	1	15	9
Absorption-Elution	21	5	3	-	1	-	15	4
LATTES-Methode	21	3	3	-	1	-	15	2
Verfahren nach HARLEY	21	5	3	-	1	-	15	3
insgesamt	84	19	12	-	4	1	60	18

a) Mischagglutination

Von den geprüften Methoden erwies sich die Mischagglutination mit Abstand als die unzuverlässigste. Sie war an den Fehlbestimmungen am häufigsten beteiligt (s.Tab. IX).

Tab. IX. Die Beteiligung der einzelnen Methoden
an den Fehlbestimmungen

Anzahl der Flecken	mit richtigem Ergebnis	Beteiligung an den Fehl- bestimmungen			
		a	b	c	d
14	nach 4 Methoden	-	-	-	-
17	" 3 "	8	3	2	4
6	" 2 "	6	5	-	1
3	" 1 "	2	1	3	3

a = Mischagglutination
b = Absorption-Elution

c = Methode nach LATTES
d = Verfahren nach HARLEY

Außerdem ist die Mischagglutination von den beiden Antigen-Nachweismethoden die umständlichere. Man kann den Versuch allerdings auch in Hohlschliff-Objektträgern anstellen (MARESCH-WEHRSCHÜTZ) und spart so das Übertragen der Fasern auf Objektträger zum Mikroskopieren. Die Ergebnisse werden dadurch nicht beeinflusst.

Beim Ablesen waren die Ergebnisse oft nicht eindeutig, so daß die Entscheidung, ob positiv oder negativ, nicht leicht zu fällen war. Richtige Erythrozytentrauben waren selten zu sehen. Meistens hafteten nur einzelne Erythrozyten an den Fasern. Die meisten Fehler entstanden durch fälschlich positive Ergebnisse (s.Tab.X.).

Tab. X. Fehlerquellen bei den 4 angewandten Verfahren

Methode	Fehler in % durch	
	negative Ergebnisse	positive Ergebnisse
Mischagglutination	5	35
Absorption-Elution	-	23
LATTES-Methode	13	-
Verfahren nach HARLEY	20	-

Fehlerquellen: Folgende Fehlermöglichkeiten werden in der Literatur beschrieben:

1. Unspezifische Agglutinationen durch unzureichendes Auswaschen der nicht gebundenen Antikörper: Diese Fehlerquelle konnte durch Prüfung der letzten Waschlösung auf negative Agglutination gegen A- und B-Blutkörperchen ausgeschlossen werden. Die Ansätze wurden jeweils mindestens sechsmal gewaschen. Bei HANHOFF blieben die Kontrollreaktionen bei 480 Ansätzen nach sechsmaligem Waschen immer negativ. NICKOLLS und PEREIRA halten bei Leinensubstraten dreimaliges Waschen für ausreichend.

2. Verunreinigungen: Fehler durch adsorbierende Substanzen (Fett, Schmutz) in den Ansätzen (OUTTERIDGE) oder durch Verunreinigung der Substrate mit Bakterien (COOMBS) ließen sich nicht sicher ausschließen. Es wurde jedoch immer auf peinliche Sauberkeit geachtet.

3. Pseudoagglutinationen: Pseudoagglutinationen können bei älteren Blutkörperchenaufschwemmungen auftreten. Da immer frische Blutkörperchenaufschwemmungen zur Verfügung standen, brauchte diese Fehlerquelle hier nicht beachtet zu werden. Pseudoagglutinationen durch Eintrocknungsvorgänge konnten durch Aufbewahren der Ansätze in der feuchten Kammer vermieden werden.

b) Absorption-Elution

Die Absorption-Elution ist mit rund 23% Fehlbestimmungen wesentlich sicherer als die Mischagglutination, ihre Fehlerzahl liegt jedoch im Vergleich zu den Angaben anderer Autoren erstaunlich hoch. HANHOFF kam bei 480 bis 8 Monate alten Blutflecken immer zu dem richtigen Ergebnis, SCHLEYER (1963) gibt die Fehlerquote der Absorption-Elution mit 4% an.

Im Gegensatz zur Mischagglutination waren hier die Ergebnisse immer eindeutig. Bei deutlich positivem Ergebnis ließen sich die Agglutinate meistens schon makroskopisch erkennen. Bei schwach positivem Ergebnis waren unter dem Mikroskop vereinzelte kleine Agglutinate zu erkennen. Die falschen Ergebnisse sind alle durch Fehlagglutinationen entstanden (s.Tab.X). Bezüglich der Fehlerquellen gilt das selbe wie bei der Mischagglutination.

Eine Abhängigkeit vom Fleckenalter zeigte sich bei den beiden Agglutinen-Nachweismethoden nicht. HANHOFF konnte die Agglutinogene noch nach 8 Monaten sicher nachweisen.

c) Methode nach LATTES

Mit dieser Methode wurden die besten Ergebnisse erzielt (s.Tab. VII). Ihre Irrtumswahrscheinlichkeit wird von SCHLEYER (1963) mit 8% und von PRINZ mit 5% angegeben. (PRINZ benutzte jedoch Blutschüppchen, die aus 2 Jahre alten, im Kühlschrank aufbewahrten Alkoholbluten angelegt waren, und begann gleich nach dem Eintrocknen mit dem Agglutinin-Nachweis). Sie ist einfach auszuführen und erfordert wenig Zeit. Die Ergebnisse waren immer eindeutig, das Ablesen bereitete keine Schwierigkeiten. Die

Fehler entstanden alle durch das Ausbleiben von Agglutinationen (s.Tab.X). Sie sind wohl darauf zurückzuführen, daß die Agglutinine zu schwach oder schon geschwunden waren.

d) Verfahren nach HARLEY und MERKELEY

Auch diese Agglutinin-Nachweismethode ist den beiden Antigen-Nachweismethoden überlegen (s.Tab.VII). Sämtliche Fehler entstanden durch das Ausbleiben von Agglutinationen, also durch zu schwache oder schon geschwundene Agglutinine (s.Tab.X). BRENIG fand eine starke Abhängigkeit vom Alter (s.Tab.XI).

Tab. XI. Fehlerprozentsätze der Agglutinin-Nachweismethode nach HARLEY und MERKELEY (nach BRENIG)

Fleckenalter in Wochen	Fehler in %
1	8
2	0
4	31
8	77

Da die Flecken alle älter als 3 Wochen waren, ist die Fehlerzahl auf diese Weise zu erklären und mit den Ergebnissen BRENIGs in Einklang zu bringen. Die Ergebnisse waren deutlich und sicher abzulesen. Die Methode ist etwas umständlich, aber die gewonnenen Extrakte konnten gleichzeitig für den Gm(a)-Nachweis (s.u.) verwendet werden.

C. MN - System

1. Methodik

a) Mischagglutination

Es wurde vorgegangen wie unter B 1 a beschrieben.
Es wurden Anti-M und Anti-N- Immunsere von Kaninchen
mit folgendem Titer verwendet:

Anti-M-Serum gegen M-Blutkörperchen 1:16 bis 1:32,

Anti-N-Serum gegen N-Blutkörperchen 1:16.

Die Faktoren M, N und MN wurden nach dem Schema der
Tab.XII ermittelt.

Tab. XII. Die möglichen Reaktionen bei der Mischagglutination zur Bestimmung der MN-Blutgruppen

Spur	M M	N N	MN MN
Serum	N M	N M	N M
Testblut- körperchen	M N	M N	M N
Ergebnis	+ -	- +	+ +

b) Absorption-Elution

Prinzip und Technik sind unter B 1 b beschrieben.
Es wurden die gleichen Seren benutzt wie bei der Mischagglutination (s.unter C 1 a). Tab. XII gibt die möglichen Reaktionen wieder.

2. Ergebnisse

Tab. XIII. Mischagglutination

Nr.	Fleckenalter Tage	Blutgruppe des Fleckens	bestimmte Blutgruppe	Ergebnis
16	10	M	MN	f
17	"	MN	M	f
31	11	M	M	r
32	"	MN	M	f
33	"	M	M	r
34	"	N	--	f
35	"	MN	MN	r
18	16	MN	MN	r
19	"	MN	MN	r
20	"	MN	N	f
21	"	MN	M	f
36	22	M	MN	f
37	"	MN	N	f
38	"	MN	MN	r
39	"	M	--	f
40	"	M	MN	f
22	23	M	N	f
23	"	M	MN	f
24	"	N	MN	f
25	"	N	N	r
26	28	MN	N	f
27	"	M	MN	f
28	"	M	MN	f
29	30	MN	--	f
30	"	M	MN	f
1	31	MN	MN	r
2	"	N	MN	f
3	41	MN	MN	r
4	"	MN	M	f
5	42	M	MN	f
6	"	MN	M	f
7	"	MN	M	f
8	"	MN	M	f
9	49	N	--	f
10	"	M	--	f
11	"	MN	M	f
12	"	N	--	f
13	52	N	N	r
14	"	MN	N	f
15	"	M	MN	f

Tab. XIV. Absorption-Elution

Nr.	Fleckenalter Tage	Blutgruppe des Fleckens	bestimmte Blutgruppe	Ergebnis
16	11	M	M	r
17	"	MN	MN	r
18	"	MN	M	f
19	"	MN	M	f
20	"	MN	N	f
31	18	M	MN	f
32	"	MN	MN	r
33	"	M	M	r
34	"	N	N	r
35	"	MN	MN	r
36	21	M	M	r
37	"	MN	M	f
38	"	MN	M	f
39	"	M	M	r
40	"	M	M	r
1	34	MN	MN	r
2	"	N	MN	f
21	35	MN	MN	r
22	"	M	M	r
23	"	M	M	r
24	"	N	N	r
25	"	N	N	r
26	"	MN	M	f
27	37	M	M	r
28	"	M	M	r
29	"	MN	M	f
30	"	M	M	r
3	41	MN	M	f
4	"	MN	M	f
5	42	M	M	r
6	"	MN	M	f
7	50	MN	M	f
8	"	MN	M	f
9	"	N	--	f
10	"	M	M	r
11	51	MN	M	f
12	"	N	N	r
13	"	N	N	r
14	"	MN	M	f
15	"	M	M	r

3. Besprechung

Beide Methoden zur MN-Bestimmung erwiesen sich als sehr unzuverlässig (s.Tab. XV).

Tab. XV. Die Fehlerquoten der beiden angewandten Verfahren zur MN-Bestimmung

Methode	Fehler in %
Mischagglutination	75
Absorption-Elution	43

Für die Ablesungssicherheit der beiden Methoden gilt dasselbe wie bei der ABO-Bestimmung: bei der Mischagglutination waren die Ergebnisse sehr unsicher, während sie bei der Absorption-Elution immer eindeutig waren. AMBROSI fand die Absorption-Elution ebenfalls zuverlässiger als die Mischagglutination. Auffallend ist, daß nicht wie bei der ABO-Bestimmung die Fehler durch positive Ergebnisse überwiegen, sondern ein Ausbleiben von Agglutinationen häufiger ist (s.Tab.XVI).

Tab. XVI. Fehlerquellen bei der MN-Bestimmung

Methode	Fehler in % durch	
	negative Ergebnisse	positive Ergebnisse
Mischagglutination	47,5	30
Absorption-Elution	37,5	5

So läßt es sich auch erklären, daß die Gruppe MN an den Fehlbestimmungen, vor allem bei der Absorption-Elution,

am häufigsten beteiligt ist (s.Tab. XVII).

Tab. XVII. Beteiligung der einzelnen MN-Gruppen
an den Fehlbestimmungen

Methode	M		N		MN	
	n	davon falsch	n	davon falsch	n	davon falsch
Mischagglutination	14	12	7	5	19	13
Absorption-Elution	14	1	7	2	19	14
insgesamt	28	13	14	7	38	27

Die Fehler der Gruppe MN entstanden vor allem durch fehlenden Nachweis des Faktors N (s.Tab. XVIII).

Tab. XVIII. Fehler der Gruppe MN durch fehlenden
Nachweis von N

Methode	n	davon falsch	fehlender Nachweis von N
Mischagglutination	19	13	8
Absorption-Elution	19	14	13

Der Faktor N ist in diesen Fällen zu schwach (AMBROSI).

Als Fehlerquellen sind außer den unter B 3 a genannten noch zu erwähnen:

1. Blutkörperchenaufschwemmungen: Nach WALLENFANG müssen die Testblutkörperchen-Suspensionen aus unmittelbar

vor der Untersuchung entnommenem Frischblut hergestellt werden, da sonst die Fähigkeit ihrer Bindung an das abgesprengte Antiserum nachläßt. Da dies nicht immer möglich war, wurden manchmal Aufschwemmungen von einige Tage altem Blut hergestellt. Die Aufschwemmungen selbst waren jedoch immer ganz frisch.

2. Titer der Antiseren: Die große Zahl ausbleibender Agglutinationen läßt sich vielleicht auf zu schwache Antiseren zurückführen. WALLENFANG benutzte Seren mit höheren Titern: Anti-M-Serum 1:32, Anti-N-Serum 1:64. Die meisten Fehler entstanden durch fehlenden Nachweis des N-Antigens.

Allerdings können nach ALLEN, CORCORAN und ELLIS auch Fehler bei der Verwendung hochtitriger Antiseren entstehen. Hochtitrige Anti-N-Seren reagieren mit der überwiegenden Mehrzahl von M-Bluten, da diese eine kleine Menge N-Antigen enthalten. Es wird deshalb empfohlen, MN-Untersuchungen mit mittelstarken und schwachen Anti-N-Seren vorzunehmen.

Eine deutliche Abhängigkeit vom Alter der Blutflecken ließ sich nicht nachweisen. WALLENFANG konnte bei der Untersuchung von 48 drei Monate alten Blutflecken in allen Fällen die MN-Zugehörigkeit exakt klären. AMBROSI fand bei der Untersuchung von 40 bis zu vier Monate alten Flecken keine Abhängigkeit vom Alter. In der vorliegenden Untersuchung waren die Blutflecken nicht älter als 52 Tage.

D. Haptoglobin-System

1. Methodenangaben der Literatur

Für den Haptoglobin-Nachweis aus Blutflecken liegt noch keine optimale Technik vor. Bisher versuchte Nachweismethoden sollen hier kurz beschrieben werden:

1. Verfahren nach DÜRWARD: Die Trockenblutspur wird in verdünnter Hb-Lösung gelöst und die Lösung auf einem eingehängten langen Filterpapierstreifen eingeeengt. Das unmittelbar unter dem Endteil mit der maximalen Verfärbung liegende Streifenstückchen wird nach Anfeuchten mit Wasser in den Stärkegel zur Elektrophorese eingebracht.

2. Verfahren nach HALLERMANN-STÜRNER: Nach elektrophoretischer Behandlung der Spur im Agargel wie zur Gc-Bestimmung wird Neugeborenen Serum in den Antikörperkanal eingefüllt, der Ansatz für 40 min bei 37°C belassen und der Kanal mit Antimensch-Serum beschickt. Dann wird ge- und entfärbt wie bei der Gc-Bestimmung. Es entstehen Präzipitate, die nur auf Hp zu beziehen sind, da alle anderen Antikörperfraktionen durch das Neugeborenen Serum abgesättigt sind; dieses ist nämlich in etwa 90% der Fälle noch Hp-frei (PROKOP-BUNDSCHUH).

3. Verfahren nach CULLIFORD: Fleckenstückchen werden in Tris-Puffer für 1-2 h in der feuchten Kammer eingeweicht und dann in das Stärkegel eingebettet. Nach der elektrophoretischen Trennung wird mit Amidoschwarz gefärbt.

4. Verfahren nach FALK-BUNDSCHUH: Es sind große Materialmengen erforderlich. Die Spurenextrakte müssen binnen 2 h in die Elektrophorese eingebracht werden. Am besten ist Trennung im Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 7 oder im Boratpuffer bei pH 11 unter

Verminderung der Stromstärke und Verlängerung der Trennzeit bis zu 6 h.

5. Verfahren nach VOGEL: Das Blutfleckenmaterial wird in Wasser gelöst. Von einer aus Blutkörperchen hergestellten Hämoglobinstammlösung werden 3 Tropfen hinzugefügt. Das Gemisch wird für 2 h in den Kühlschrank gestellt. Dann wird die Lösung auf dem Wasserbad bis auf $1/5$ der ursprünglichen Menge eingengt. Der Rest wird nach Art der aufsteigenden Papierchromatographie auf leichtsaugendes Papier hochlaufen gelassen, wobei die Flüssigkeit verdunstet. Die angefärbten Zonen des Chromatogramms werden insgesamt herausgeschnitten und in 5 Tropfen Gelpuffer wieder gelöst. Nach Zugabe von 3 Tropfen Hb-Stammlösung wird die Flüssigkeit auf Filterpapierstückchen aufgesaugt und in die Stärkegel-Elektrophorese eingebracht.

6. Verfahren nach HEIFER: Die Fleckenextrakte werden eingengt und auf Filterpapierstreifen aufgenommen. Nach Zusatz einer Hb-Lösung von 250 mg-% werden sie der Stärkegel-Elektrophorese unterworfen.

7. Verfahren nach GERVAIS-VIESCOU: Das Blutfleckenmaterial wird in Wasser gelöst. Durch Zentrifugieren wird das Erythrozytenstroma von dem Spurenextrakt getrennt und dieser in Acrylamidgel zur Elektrophorese eingebracht.

8. Verfahren nach CULLIFORD und WRAXALL: Immunelektrophoretische Behandlung der Spur im Agargel unter Verwendung des Puffersystems nach HIRSCHFELD, (wie zur Gc-Bestimmung). Genügend Fleckenmaterial, um die Antigenhöhlung (Schlitze) zu füllen, wird in einem Minimum an Gelpuffer eingeweicht und nach 30 - 60 min in das Gel eingebracht. Nach $4\frac{1}{2}$ bis 5 h Elektrophorese bei 4°C wird Anti-Haptoglobin-Serum (1:4 in Gelpuffer gelöst) in den Antikörperschlitz eingefüllt. Nach 24 bis 36 h kann abgelesen werden. Die Hp-Typen unterscheiden sich durch Lage, Länge und Form der

Präzipitatbögen. Es konnten bis zu 3 Monate alte Flecken exakt differenziert werden.

2. Eigene Versuche

Zunächst wurde die Technik der Stärkegel-Elektrophorese zur Haptoglobinbestimmung an Seren mit bekanntem Hp-Muster erlernt. Boratpuffer und Stärkegel wurden nach der Originalvorschrift der Firma BIOTEST hergestellt. Die pH-Werte der Puffer betrugen 10,5 - 11,0 für den Gelpuffer und 8,5 - 9,0 für den Brückenpuffer. Es wurde die Elektrophoresekammer der Firma BIOTEST nach PROKOP benutzt. Die Laufzeit betrug 2 h bei einer Stromstärke von 30 mA und einer Klemmenspannung von 220 Volt. Zur Herstellung der Hämoglobininlösung wurde Blutkuchen durch ein feines Sieb gedrückt und das Filtrat 5 mal mit 2-3% NaCl-Lösung 2 mal gewaschen. Das sauber gewaschene Erythrozytensediment wurde mit der dreifachen Menge Wasser aufgefüllt. Gefärbt wurde mit Benzidin- und Bariumperoxidpulver (Verhältnis 1:4) in Eisessig-Wasser-Gemisch (Verhältnis 5:4) unter Lösung einer Messerspitze des Pulvergemisches in 9 ml.

Es wurde zunächst versucht, das Hp-Muster einiger 3 Tage alter Blutflecken (Größe etwa 3 x 3 cm) mit der Methode nach VOGEL zu bestimmen. Die Flecken wurden in schmale Streifen geschnitten und in Röhrchen mit Wasser gut bedeckt über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Dann wurden die Stoffstreifen mit einer Pinzette ausgepreßt und auf ein Stückchen Perlonstrumpf gebracht, das als Sieb im oberen Drittel des Röhrchens mit dem Korken fixiert wurde (nach LEONHARDT). So konnte durch Zentrifugieren die Extraktflüssigkeit ganz aus dem Stoff gewonnen werden.

Die Extrakte wurden weiter so behandelt, wie von VOGEL angegeben, und dann in die Elektrophorese eingebracht. Von keinem Flecken war ein eindeutiges Hp-Muster zu erkennen. Die Laufstrecke war durch das Hämoglobin und auch durch das reichlich gebildete Methämalbumin stark verschmiert.

PROKOP-BUNDSCHUH empfehlen zur Vermeidung der Verschmierung durch das Hämoglobin die Elektrophorese in einem Phosphatpuffergel bei pH 7. (LAURELL hat diesen Puffer in die Hp-Bestimmungstechnik eingeführt). In diesem pH-Bereich erfährt das freie Hämoglobin eine Ladungsverschiebung und stellt sich kathodenwärts vom Impfspalt dar. Es wurden einige Fleckenextrakte in Phosphatpuffergel eingebracht. Die Auftrennung ist dabei jedoch schlechter als im Boratpuffergel; infolgedessen kamen die schwachkonzentrierten Haptoglobine der Extrakte gar nicht zur Darstellung.

Nun wurden im Blindversuch 20 Blutflecken von etwa 2,5 x 3 cm Größe 3 Tage nach dem Eintrocknen nach der von HEIFER angegebenen Methode untersucht. Die Extrakte wurden gewonnen wie oben beschrieben. Die Ergebnisse sind in Tab. XIX zusammengestellt.

3. Ergebnisse und Besprechung

Von den 20 Blutflecken konnte in 14 Fällen der richtige Hp-Typ bestimmt werden (s. Tab. XIX). Die Ablesungssicherheit wurde mit folgender Bewertung versehen: ++ = sehr deutlich, + = deutlich, (+) = schwach, ? = nicht zu erkennen.

Tab. XIX. Ergebnisse der Hp-Bestimmungen nach dem Verfahren nach HEIFER

Nr.	Hp-Typ des Fleckens	bestimmter Hp-Typ	Ablesungs- sicherheit
1	2-1	2-1 oder 2-2	?
2	2-1	2-1	+
3	1-1	-	?
4	1-1	1-1	(+)
5	1-1	1-1	++
6	2-1	2-1	(+)
7	2-1	2-1	+
8	2-2	2-2	(+)
9	2-2	2-2	(+)
10	2-2	2-2	+
11	2-1	-	?
12	2-1	2-1	+
13	1-1	1-1	(+)
14	2-1	2-1	(+)
15	2-2	2-2	+
16	2-2	-	?
17	2-1	2-1	++
18	2-2	2-1 oder 2-2	?
19	2-1	2-1	(+)
20	2-1	-	?

Es sind im wesentlichen zwei Faktoren, die die Hp-Bestimmung aus Blutflecken erschweren: eine zu schwache Konzentration der aus den Flecken gewonnenen Haptoglobine und die starke Verschmierung der Laufstrecke bei der Elektrophorese durch Hämoglobin und Methämalbumin. Die Konzentration hängt ab von der Menge des Fleckenmaterials, der Methode der Extraktion und von dem ursprünglichen Hp-Spiegel des Serums. Entscheidend ist jedoch das Alter der Flecken. Nach PROKOP-BUNDSCHUH nimmt die Nachweisbarkeit der Haptoglobine aus Blutflecken nach dem 2.-3.Tag stark ab, HEIFER konnte an 14 Tage alten Blutflecken nur noch bei 8 von 20 Blutspuren den Hp-Typ differenzieren. MOLNAR fand Hp nach 2 Monaten noch in 70% der Versuche.

PROKOP-BUNDSCHUH nehmen an, daß durch die Eintrocknung des Blutes oder durch Zerfall der Erythrozyten oder anderer geformter Blutbestandteile eine Substanz frei wird, welche die Hb-Bindungsfähigkeit der Haptoglobine zerstört. HEIFER führt die schlechte Nachweisbarkeit der Haptoglobine in der Vollblutspur auf die Hämolyse und zusätzliche, möglicherweise auch bakteriell bedingte Eiweißzerfallserscheinungen zurück.

FIORI empfiehlt die Hp-Bestimmung nur bei reichlich vorhandenem Fleckenmaterial. Nur ganz eindeutige Elektrophoresemuster sollten ausgewertet werden. Das Verfahren nach HEIFER erscheint als die einfachste und sicherste Methode zum Haptoglobin-Nachweis aus Blutspuren. Durch die schlechte Nachweisbarkeit in älteren Flecken sind jedoch auch dieser Methode Grenzen gesetzt. Das Verfahren nach VOGEL und die Auftrennung im Phosphatpuffergel nach PROKOP-BUNDSCHUH erwiesen sich als unzuverlässig. Die noch nicht veröffentlichte Methode von CULLIFORD und WRAXALL wurde nicht erprobt.

E. Gm - System

1. Grundlagen und Methodik

O-Rh-positive, anti-Rh-sensibilisierte, mit dem Gm-Faktor beladene Erythrozyten werden durch das homologe Anti-Gm-Serum agglutiniert. Wird zum Antiserum vorher Gm-haltiges Substrat (Spurenextrakt) gegeben, so wird der Antikörper spezifisch gebunden; die Agglutination wird gehemmt, das Substrat war Gm-positiv. Gm-negative Substrate verhindern die Agglutination nicht.

Die Gm-Substanz ist äußeren Einflüssen gegenüber äußerst widerstandsfähig und eignet sich deshalb gut zum Nachweis in Blutspuren. In der vorliegenden Arbeit wurde nur der Gm(a)-Faktor bestimmt.

Es gibt zwei Möglichkeiten zur Extraktion der Gm-Substanz aus Blutflecken: Aus dem Blutfleck werden ein oder mehrere Stückchen herausgeschnitten und in wenig NaCl-Lösung gelöst. Nach 12-24 h wird der Extrakt wie Probandenserum, allerdings unverdünnt, in den Hauptversuch eingebracht ("Lösungsmethode"). Bei der "Absorptionsmethode" wird das Fleckenstückchen direkt mit Anti-Gm-Serum in Kontakt gebracht. Das Substrat wird für etwa 15 h mit unverdünntem Anti-Gm-Serum bedeckt. Ist die Blutspur Gm-positiv, so wird das Anti-Gm-Serum absorbiert, so daß sensibilisierte Erythrozyten durch das mit einer Kapillare abgesaugte Serum nicht mehr agglutiniert werden können. Die beiden Methoden sind in ihrer Brauchbarkeit gleichwertig (HAUPT), bei der Absorptionsmethode benötigt man jedoch wesentlich mehr Anti-Gm-Serum. Es wurde deshalb die Lösungsmethode angewandt. Die Extrakte wurden gewonnen wie unter B 1 d beschrieben. Meistens war von den Extrakten zum Agglutinin-Nachweis nach HARLEY noch genug für die Gm(a)-Bestimmung übrig.

Technik des Gm(a)-Nachweises (im wesentlichen nach den üblichen Arbeitsanweisungen für Anti-Gm(a)-Seren):

A. Sensibilisierung der Erythrozyten

1. Rh-positive Erythrozyten der Blutgruppe 0 3mal in NaCl-Lösung waschen.
2. 0,2 ml des Sediments mit 1,8 ml eines mit NaCl-Lösung 1:10 verdünnten Anti-D-Serums "zur Gm(a)-Bestimmung" 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubieren. Das Rh-Serum enthält Gm(a)-Substanz.
3. 4mal mit je etwa 50facher Menge NaCl-Lösung waschen.
4. Das Sediment in 4 ml NaCl-Lösung aufschwemmen (= etwa 5%ige Suspension).

B. Reaktionsansatz

1. Auf einer Reaktionsbahn des Plexiglasobjektträgers nach LAUER-HOPPE 1 Tropfen des verdünnten Anti-Gm(a)-Serums mit 1 Tropfen Spurextrakt mischen.
2. Nach 5-10 min 1 Tropfen der sensibilisierten Erythrozytensuspension dazugeben und mischen.
3. Die Reaktionsansätze einschließlich Kontrollen (s.u.) in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur 1 h inkubieren.
4. Zum Ablesen die Objektträger vorsichtig hin- und herkippen.

C. Kontrollen

1. 1 Tropfen Spurextrakt + 1 Tropfen NaCl-Lösung + 1 Tropfen sensibilisierte Erythrozytensuspension (diese Kontrolle muß immer negativ ausfallen).
2. Für jeweils eine Untersuchungsserie 1 Tropfen verdünntes Anti-Gm(a)-Serum + 1 Tropfen NaCl-Lösung + 1 Tropfen sensibilisierte Erythrozytensuspension (diese Kontrolle muß positiv ausfallen).

Die Erythrozyten wurden jeweils kurz vor Beginn der Untersuchung entnommen; nach der Sensibilisierung wurden sie gleich verwendet.

2. Ergebnisse

Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tab. XX wiedergegeben.

Tab. XX Ergebnisse der Gm(a)-Bestimmung

Nr.	Fleckenalter Tage	Gm(a)-Typ des Fleckens	bestimmter Gm(a)-Typ	Ergebnis
31	20	Gm(a-)	Gm(a-)	r
32	"	Gm(a-)	Gm(a-)	r
33	"	Gm(a-)	Gm(a-)	r
34	"	Gm(a-)	Gm(a-)	r
35	"	Gm(a-)	Gm(a-)	r
36	"	Gm(a-)	Gm(a-)	r
37	"	Gm(a-)	Gm(a-)	r
38	"	Gm(a-)	Gm(a-)	r
39	"	Gm(a-)	Gm(a-)	r
40	"	Gm(a-)	Gm(a-)	r
16	51	Gm(a-)	Gm(a-)	r
17	"	Gm(a-)	Gm(a-)	r
18	"	Gm(a+)	Gm(a+)	r
19	"	Gm(a-)	Gm(a-)	r
20	"	Gm(a-)	Gm(a-)	r
21	"	Gm(a-)	Gm(a-)	r
22	"	Gm(a-)	Gm(a-)	r
23	"	Gm(a+)	Gm(a+)	r
24	"	Gm(a-)	Gm(a-)	r
25	"	Gm(a-)	Gm(a-)	r
26	"	Gm(a-)	Gm(a-)	r
27	"	Gm(a-)	Gm(a-)	r
28	"	Gm(a+)	Gm(a+)	r
29	"	Gm(a+)	Gm(a+)	r
30	"	Gm(a+)	Gm(a+)	r
1	71	Gm(a+)	Gm(a+)	r
2	"	Gm(a+)	Gm(a+)	r
3	"	Gm(a-)	Gm(a-)	r
4	"	Gm(a+)	Gm(a+)	r
5	"	Gm(a+)	Gm(a+)	r
6	"	Gm(a+)	Gm(a+)	r
7	"	Gm(a+)	Gm(a+)	r
8	"	Gm(a+)	Gm(a+)	r
9	"	Gm(a-)	Gm(a-)	r
10	"	Gm(a-)	Gm(a-)	r
11	"	Gm(a+)	Gm(a+)	r
12	"	Gm(a+)	Gm(a+)	r
13	"	Gm(a-)	Gm(a-)	r
14	"	Gm(a-)	Gm(a-)	r
15	"	Gm(a+)	Gm(a+)	r

3. Besprechung

An allen Blutflecken wurden die Gm(a)-Typen richtig bestimmt. Die Reaktionen waren immer mit bloßem Auge deutlich abzulesen, meistens schon nach 30 min. Die Extrakte waren alle deutlich rötlich bis rot gefärbt. Nach HAUPT steht die Menge des gelösten Hämoglobins in einer gewissen Beziehung zur Menge der herausgelösten Gm-(Hemm)substanz, und es sind nur bei Extrakten, die rötlich oder mindestens deutlich gelb gefärbt sind, sichere Ergebnisse zu erwarten.

Da der Gm(a)-Faktor gegenüber äußeren Einflüssen sehr widerstandsfähig ist und sich lange Zeit nachweisen läßt (HAUPT konnte an 150 Blutspuren auf verschiedenem Trägermaterial den Gm(a)-Faktor noch nach 21 Wochen sicher nachweisen), eignet er sich sehr gut zur Identifizierung von Blutflecken. Von den geprüften Methoden ist der Gm(a)-Nachweis bei weitem am zuverlässigsten.

F. Zusammenfassung

Aufgabe der Untersuchung war die Anwendung der von anderen Untersuchern als optimal ermittelten Methoden zum Nachweis der Eigenschaften ABO, MN, Hp und Gm an Blutflecken auf Textilien und zwar im Blindversuch. Als Substrat dienten 40 Blutflecken auf Leinen, die von anderer Hand hergestellt waren. Es wurden angewandt: für die ABO-Eigenschaften die Verfahren der Mischagglutination, der Absorption-Elution, die Methoden nach LATTES und nach HARLEY und MERKELEY, für die MN-Eigenschaften die beiden erstgenannten Verfahren, für die Hp-Merkmale die Methode nach HEIFER und für die Gm-Eigenschaft die Lösungsmethode.

Für das ABO-System ergab sich ein Gesamtfehler von 24%, für das MN-System von 59%, für das Hp-System von 30% und für das Gm-System von 0%. Von den einzelnen Methoden zur ABO-Bestimmung erwies sich die Mischagglutination als am unzuverlässigsten, die LATTES-Methode als am zuverlässigsten. Die Bestimmung der Faktoren M und N gelang besser als die des Faktors MN.

Es zeigte sich, daß die Richtigkeit der Ergebnisse bei den Agglutinin-Nachweismethoden und besonders beim Hp-Nachweis stark vom Alter der Flecken abhängt.

G. Literatur

- ALLEN, F., P.CORCORAN
and F. ELLIS Some new observations on the
MN-System. Vox.Sang. 5, 224,
1960. Zit. nach WALLENFANG
- AMBROSI, L. La determinazione del sistema
MN nelle macchie di sangue.
Giornale di Med.Leg.Infortu-
nistica e Tossicologia 10,
283, 1964
- BRENIG, N. Vergleichende Untersuchungen
über den optimalen Nachweis
von Isoagglutininen in Blut-
fleckchen.
Diss. Bonn 1964
- COOMBS, R. and B. DODD Possible Application of the
Principle of Mixed Agglutina-
tion in the Identification
of Blood Stains.
Med.Sci.Law, 1, 359, 1961
- CULLIFORD, B. Haptoglobins and Transferrins
in Forensic Blood Stains.
Nature 198, 796, 1963
- CULLIFORD, B. and
B.WRAXALL Haptoglobin Types in Dried
Blood Stains.
Nature 211, 872, 1966
- DÜRWARD, W. Haptoglobinnachweis in Blut-
fleckchen.
Acta med. leg. 16, 67, 1963.
Zit. nach SCHLEYER.
- FALK, H. und G.BUNDSCHUH Haptoglobine in Blutspuren.
Acta med. leg. 16, 63, 1963.
Zit. nach SCHLEYER.
- FIORI, A. und M.MARIGO The Reability of Gc and Hp
Grouping of Blood Stains.
3. Kongr.Poln.gerichtl.Med.,
Breslau 1965

- GERVAIS, P. et C.VIESCOU Les possibilités de l'électrophorèse en gel d'acrylamide pour l'identification des taches de sang par les groupes d'haptoglobines.
Ann.méd.lég. 45, 244, 1965
- HALLERMANN, W. und K.STÜRNER Untersuchungen über die Möglichkeit des Nachweises der Haptoglobintypen in experimentell bereiteten Blutspuren auf Stoffstücken.
41.Kongr.Ges.gerichtl.Med.Münster 1962. Zit.nach SCHLEYER.
- HANHOFF, K. Untersuchungen zur ABO-Gruppenbestimmung in Blutflecken mittels des Mischagglutinationsverfahrens.
Diss. Bonn 1963
- HAUPT, P. Der Nachweis des Gm(a)-Faktors in Blutspuren.
Diss. Bonn 1964
- HEIFER, U. Untersuchungen über das Haptoglobin und Methämalbumin in Blut, Blutspuren und Sperma mittels Stärkegel-Elektrophorese. Blut 10, 113, 1964
- LEONHARDT, H. Untersuchungen über optimale Verfahren zum Nachweis von Blut- und Serumgruppen in Spermaflecken.
Diss. Marburg, im Druck
- MARESC, W. und E.WEHRSCÜTZ Moderne Methoden der Blutflecken-diagnostik. Arch.Kriminol. 132, 1, 1963
- NICKOLLS, L. and M.PEREIRA A Study of Modern Methods of Grouping Dried Blood Stains.
Med.Sci.Law 2, 172, 1962
- MOLNAR, V. Méthodes actuelles dans l'expertise des taches de sang.Probl. Med.judic.drim.(Bukarest) 1, 81, 1964, Ref.Z.gerichtl.Med.56, 519, 1965

- OUTTERIDGE, R. Absorption-Elution Grouping of
Blood Stains.
Nature 194, 385, 1962
- PRINZ, B. Vergleichende Untersuchungen zur
ABO-Gruppenbestimmung 2 Jahre
alter Blutproben an Hand von Ag-
glutinin- und direkten Agglu-
tinogen-Nachweisen.
Diss. Bonn 1965
- PROKOP, O. und
G.BUNDSCHUH Die Technik und die Bedeutung
der Haptoglobine und Gm-Gruppen
in Klinik und Gerichtsmedizin.
Berlin (De Gruyter) 1963
- SCHLEYER, F. Vergleichende Untersuchungen zur
ABO-Gruppenzuordnung hämolyti-
scher Blutproben mit Hilfe des
LATES- und des Absättigungsver-
suches und von Absorptions-
Elutionsverfahren. Z.Hyg. 149,
281, 1963
- SCHLEYER, F. Leitfaden der gerichtlich-medi-
zinischen Blutspurenuntersuchung.
Lübeck (Schmidt-Römhild) 1966
- VOGEL, G. Untersuchung von Blutspuren-
material. Kriminalistik 16,
439, 1962
- WALLENFANG, H. Untersuchungen zur MN-Faktoren-
bestimmung an Blutaustreichen
und Blutflecken mittels Absät-
tigungs-Absprengungsverfahren.
Diss. Bonn 1964
- WIENER, A. und
M.HERMAN The Second Stage of the Aggluti-
native Reaction. J.Immunol. 36,
255, 1939, Zit. nach SCHLEYER

Herrn Professor Dr. Schleyer bin ich
für die Überlassung des Themas und
für wertvolle Hinweise sehr dankbar.

Lebenslauf

Am 31. August 1942 wurde ich als Sohn des Lehrers Heinz Münscher und seiner Ehefrau Grete, geb. Engel, in Vockerode-Dinkelberg, Bez. Kassel, geboren.

Von 1942 bis 1950 lebte ich mit meinen Eltern und meinem um zwei Jahre älteren Bruder in Vockerode-D., wo mein Vater die einklassige Volksschule leitete. Ostern 1949 trat ich in diese Volksschule ein. 1950 zogen meine Eltern nach Marburg/Lahn. Bis 1952 besuchte ich die Volksschule in Marburg. Ostern 1952 bestand ich die Aufnahmeprüfung am Städtischen Realgymnasium für Jungen (heute Martin-Luther-Schule). Ostern 1961 legte ich an dieser Schule die Reifeprüfung ab.

Für das Sommersemester 1961 wurde ich zum Medizinstudium an der Philipps-Universität Marburg zugelassen. Am 27. April 1962 bestand ich dort das Vorphysikum, am 5. August 1963 das Physikum. Im Wintersemester 1963/64 und im Sommersemester 1964 studierte ich an der Christian-Albrechts-Universität in Kiel. Seit dem Wintersemester 1964/65 bin ich wieder an der Philipps-Universität Marburg eingeschrieben. Am 23. Februar 1967 begann ich mit dem Staatsexamen. Am 25. Juli 1967 schloß ich das Staatsexamen mit der Note "Gut" ab.

Meine akademischen Lehrer waren
die Herren Professoren und Dozenten:

in Marburg: Niessing, Petry, Drawert, Dimroth, Seidel,
Walcher, Hensel, Bücher, Spiegelberg,
Wendt.

in Kiel: Lennert, Gärtner, Bernsmeier, Löhr, Huber.

in Marburg: Gedigk, Schmid, Siegert, Martini, Hamm,
Schwaiger, Buchholz, Linneweh, Braun-Falco,
Straub, Berendes, Jacob, Du Mesnil de
Rochemont, Schleyer, Exner, Rohen, Heuser,
Mann.

